

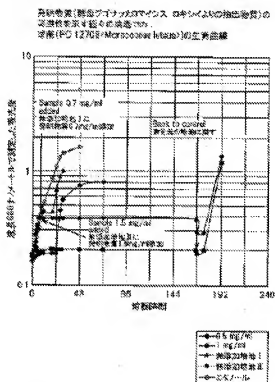
Close

Patent JP2001218594A2 View Image
 Patent C (Score 2) Detail
 Evaluation
 Issued August 14, 2001
 Title CYTOCHALASIN-LIKE SUBSTANCE, GROUP EXTRACTED FROM YEAST ZYGOSACCHAROMYCES ROUXII AND METHOD FOR PRODUCING THE SAME
 Applicant TAING OK
 PURANZUBODOO SOEI KK

Abstract **Problem to be solved:** To obtain a cytochalasin-like substance group extracted from an osmotic pressure-resistant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* present in the world of nature and provide a method for producing the substance group.

Solution: This method for producing cytochalasin-like substance group comprises (1) independently cultivating the yeast *Zygosaccharomyces rouxii* and then extracting the cytochalasin-like substance group from the culture medium or (2) cultivating the yeast *Zygosaccharomyces rouxii* in a culture medium containing a sugar, e.g. glucose or the like, followed by extracting the cytochalasin-like substance group with an organic solvent, e.g. ethyl acetate or the like, and completely evaporating the organic solvent.

Representative
 Drawing



Inventor TAING OK
 Appl. No. 2000073115 (2/9/2000)
 IPC C12P-017/18;
 A23L-003/3544; C12N-001/16; A81K-007/00; A81K-035/72; A81P-031/04; C12P-017/18; C12R-001/645; C12N-001/16;
 C12R-001/645;
 Family Show Known Family Members (2 patent(s))
 Legal Status Show Legal Status / Legal Status of Family Members

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-218594

(P2001-218594A)

(43) 公開日 平成13年8月14日 (2001.8.14)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード(参考)
C 1 2 P 17/18		C 1 2 P 17/18	C 4 B 0 2 1
A 2 3 L 3/3544	5 0 2	A 2 3 L 3/3544	5 0 2 4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/16		C 1 2 N 1/16	A 4 B 0 6 5
# A 6 1 K 7/00		A 6 1 K 7/00	K 4 C 0 8 3
35/72		35/72	4 C 0 8 7

審査請求 有 請求項の数2 書面 (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-73115(P2000-73115)

(22) 出願日 平成12年2月9日 (2000.2.9)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成11年9月7日
 社団法人日本食品科学工学会開催の「日本食品科学工学会第48回大会」において文書をもって発表

(71) 出願人 500110614

タイン オク

TAING OK

鹿児島県鹿児島市宇宿町826番地 市営住
 宅4307号

(71) 出願人 500110658

株式会社プランズボード創英

東京都港区麻布十番1-4-5 深尾ビル

(72) 発明者 タイン オク

鹿児島県鹿児島市宇宿町826番地 市営住
 宅4307号

(74) 代理人 100076727

弁理士 伊東 貞雄

最終頁に続く

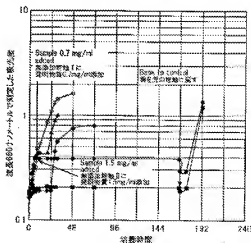
(54) 【発明の名称】 酵母ジゴサッカロマイシスロキシイ (*Zygosaccharomyces rouxii*) より抽出したサイトカラシン (Cytochalasin) 標物質群及びその製造方法

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、自然界に存在する菌浸透圧性酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*) より抽出したサイトカラシン (Cytochalasin) 標物質群を得ること及びその製造方法にある。

【解決手段】 ①酵母ジゴサッカロマイシス ロキシイを単独培養し、その培養液より抽出したサイトカラシン標物質群。②酵母ジゴサッカロマイシス ロキシイをグルコース等糖の入った培地で培養した後、酢酸エチル等有機溶媒液で抽出し、その有機溶媒液を完全に蒸びしたサイトカラシン標代謝物群の製造方法。

発見物質(酵母ジゴサッカロマイシス ロキシイより抽出物質)の
 経口投与による毒性の増強効果
 経口投与(12705 cM/mouse/kg)の生体反応



● ① 0.5 mg/kg
 ■ ② 1 mg/kg
 ▲ ③ 養液抽出液 I
 ◆ ④ 養液抽出液 II
 ○ ⑤ エタノール

【特許請求の範囲】

【請求項1】 酵母ジゴサッカロマイシス コキシイ (*Zygosaccharomyces rouxi*) を単独培養し、その培養液より抽出したサイトカラシン (*Cytochalasin*) 様物質群。

【請求項2】 酵母ジゴサッカロマイシス コキシイをグルコース等類の入った培地で培養した後、酢酸エチル等有機溶媒液で抽出し、その有機溶媒液を完全に飛ばしたサイトカラシン様代謝物質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、自然界に存在利用される耐浸透圧性酵母 (*Z. rouxi*) より抽出したサイトカラシン様物質群を得ること及びその製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 従来、ジゴサッカロマイシス コキシイは食品腐敗原因の一つとされており、この酵母の利用法はまだ発明されなかった。一方、1960年代英国の科学者によって初めて発見されたサイトカラシン物質は可逆性を持ち、抗菌性を始め、動物細胞の分裂を抑制する効果などが確認されている。しかし、従来発見されたサイトカラシン物質群は全てカビ類だけに存在していた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 「カビ類」はその性質上変性し易く安全で安定した繁殖や取扱いが難しく、生産設備も高額となるが、「酵母類」は変性し難く安全で安定した繁殖をさせられ生産設備も低額であり、何よりも「カビの毒性」の有無を心配する必要が無い。サイトカラシンやサイトカラシン様物質は初期に発見されたサイトカラシンAやBから現在サイトカラシンWまで発見されてきており、夫々独自の機能を持つ物質として色々な分野で利用されている。その一群はまだ新物質の存在の可能性が高く、従来触れていない微生物を利用して生産できる方法が必要である。抗生物や抗菌性物質の分野でもカビ類から抽出し、既に市場に出回っている薬品に対して強い副作用等が現れてきており、新薬品の開発が要求されているという問題点があった。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明は上記問題点を解決することを目的とし、①酵母ジゴサッカロマイシス コキシイを単独培養し、その培養液より抽出したサイトカラシン様物質群、②酵母ジゴサッカロマイシス コキシイをグルコース等類の入った培地で培養した後、酢酸エチル等有機溶媒液で抽出し、その有機溶媒液を完全に飛ばしたサイトカラシン様代謝物質の製造方法を特許としている。

【0005】

【発明の実施の形態】 本発明はジゴサッカロマイシス コキシイを餌の入った培地で培養する。培地は普通酵母を培養する時の培地で、糖はグルコース、スクロース、マルトース等である。

【0006】 培地の糖濃度は2%から40%までである。

【0007】 培地のpHは4から7までである。

【0008】 培養温度は10℃から35℃までである。

【0009】 培養時間は1日から7日までである。

【0010】 培養後の上澄みの収穫は遠心機にかけることによるものである。

【0011】 代謝物の抽出法は有機溶媒液を利用することである。

【0012】 上述の有機溶媒液は酢酸エチル、クロロフォルム等である。

【0013】 その後の操作は溶媒液を完全に飛ばし、得られた物質をエチルアルコールやクロロフォルム等に溶かしてジゴサッカロマイシス コキシイから生産された代謝物として収穫する。

【0014】

【発明の効果】 上述の方法で、ジゴサッカロマイシス コキシイを培養することによって回収できる未精製代謝物の量は培地1L当たり1.0g～1.6gである。

【0015】 表1はPaper disc方法を用いて8種類の細菌に対して抗菌性の検討をした結果を示す表である。

【表1】

発明物質(酵母ジブサカロマイシス ロキシイよりの抽出物質)の
ペーパーディスク法による抗菌効果

【使用細菌リスト】

枯草菌 IFO 13719 <Bacillus subtilis>
大腸菌 IFO 3301 <Escherichia coli>
シトロバクター属 <Citrobacter freundii>
コリネバクテリウム属 <Cornebacterium aquaticum>
球菌の一種 IFO 12708 <Micrococcus luteus>
サルモネラ腸炎菌 IFO 3213 <Salmonella enteritidis>
ブドウ球菌 IFO 14462 <Staphylococcus aureus>
緑膿菌 IFO 12699 <Pseudomonas aeruginosa>

ディスクの直径=6mm

発明物質	濃度	菌の直径抑制域の直径 (mm)						
		枯草菌	大腸菌	シトロバ	コリネバ	球菌の一種	サルモネラ腸炎菌	ブドウ球菌
発明物質	1.4mg	10	7	7	12	10	12	6.5
	2.1mg	13	9	9	15	12	13	7
	2.8mg	15	9.5	10	17	14	14	7
エタノール	2.0ml	—	—	—	—	—	—	—

—:効果なし

【0016】実験方法はシャーレーに普通の寒天培地を入れ、その上に菌を接種したソフトアガー(0.5%寒天)培地をまいた後、その上にZ. rouxiiから抽出した本発明の物質(以下、サンプルと書く)および対照物のつけたPaper discを載せて30℃で一晩培養し、discの周りに菌が繁殖せず、透明になる論理である。その結果、対照物エタノールでは効果は全くなかったのに対し、サンプルではサンプルの量を増やせば増やすほど効果が強くなったことが分かる。

【0017】図1はBacillus toyoi(バチルス、緑菌の一種)に対しての抗菌性を示す図である。実験方法は試験管の中に普通の液体培地を入れサンプル濃度を1.8mg/ml、3.5mg/mlとなるように添加した。サンプルの入っていない(濃度0mg/ml)ものを対照とした。それぞれに対象菌を接種して30℃で12時間培養し、菌の生育を吸光度計で測った生育曲線である。(a)のグラフは培地のpHを5.5に調整したもので、(b)のグラフはpHを6.0に調整したものである。その結果、pH6.0よりpH5.5で菌の生育がはっきりと抑制されたことが分かる。pH5.5でサンプルの濃度が3.5mg/mlに

なると菌は全く繁殖しなかったことが分かる。

【0018】図2はEscherichia coli(大腸菌)に対しての抗菌性を示す図である。実験方法は図1と同様でpH5.5での結果を表わしている。サンプルの濃度を2.0mg/mlにした場合pHを5.5に調整したものにも無調整のもの(pH4.6)にも効果があることが分かる。

【0019】図3はPseudomonas aeruginosa(緑膿菌)に対しての抗菌性を示す図である。実験方法ならびに結果は図2の大腸菌と同様である。

【0020】図4(a)、(b)はSalmonella enteritidis(食中毒を起すサルモネラ腸炎菌)に対しての抗菌性を示す図である。実験方法は図1と同様で、(a)はpH5.5、(b)はpH6.0での生育グラフである。pH6.0よりpH5.5で菌の繁殖および生育が共に抑えられたことが分かる。

【0021】図5はMicrococcus luteus(球菌の一種)に対してpH5.5での抗菌性を示す図である。実験方法は図1と同様であるが培養時間を2.4時間までした。サンプルの入っていない対照に対して、サンプル濃度2mg/ml入った試験管には菌が2.4時間経っても繁殖しなかったことが分かる。

【0022】図6はStaphylococcus a

ureus (ブドウ球菌) に対して pH 5.5 での抗菌性を示す図である。実験方法は図 1 と同様である。サンプルを 2 mg/ml 入れて無調整 pH の 4.6 のときでも pH を 5.5 に調整したときでも菌は 24 時間まで繁殖せずサンプルの効果があるということが分かる。

発明物質 (酵母ジゴサッカロマイシス ロキシイよりの抽出物質) の細菌生育抑制最低濃度

細菌名	生育抑制最低濃度 mg/ml		
	pH 調整前	pH 5.5	pH 6.0
〔グラム陽性細菌〕			
枯草菌 IFO 13719 < Bacillus subtilis >	1~2	4~5	>5
バチルス、桿菌の一種 < Bacillus toyoii >	1	2~3	>5
腸球菌 IFO 12588 < Enterococcus faecalis >	2	>4	NT
芽菌の一種 IFO 12708 < Micrococcus luteus >	1~2	2	>4
サルモネラ菌 IFO 3313 < Salmonella enteritidis >	0.7	1	2~3
ブドウ球菌 IFO 14462 < Staphylococcus aureus >	1~2	2	NT
〔グラム陰性細菌〕			
大腸菌 IFO 3201 < Escherichia coli >	2	>4	NT
肺炎菌 IFO 12689 < Pseudomonas aeruginosa >	1	1	NT

NT: 繁殖

【0024】この表は図 1~図 6 に示した抗菌性実験を各菌に対して行った結果をまとめたものである。細菌はグラム陽性、グラム陰性と大別してある。各菌に対して生育抑制最低濃度 (MIC) を無調整の pH、pH 5.5、pH 6.0 にて表わしてある。pH を調整しなければ少量でサンプルの抗菌性が見られ、このサンプルの効果は pH を下げると共に現れると推定される。無調整の pH での生育抑制最低濃度 (MIC) はサルモネラ菌で 0.7 mg/ml、ブドウ球菌で 1~2 mg/ml である。大腸菌で 2.0 mg/ml である。

【0025】図 7 は *Micrococcus luteus* (細菌の一種) におけるサンプルの抗菌性が可逆的であることを示す図である。実験方法は図 1 と同様である。サンプルの濃度を 0.5 mg/ml と 1 mg/ml にした。対照としてはエタノールを 20 ml/ml になるように加えた。また無添加の普通の培地も Control 1, Control 11 として使った。エタノールを加えた試験管には菌が通常通り生育し、48 時間培養後生育のピークを迎えた。サンプルを 0.5 mg/ml 加えた試験管には 24 時間まで菌の生育が抑制されたものの 24 時間後には弱いながら繁殖してきた。それに対し、サンプルを 1.0 mg/ml 加えた試験管には菌が 168 時間経っても育成しなかった。Control 1 と Control 11 の試験管では菌の生育は共に通常

であった。それらを 12 時間培養して菌の数を増やしてからサンプルを 0.7 mg/ml と 1.5 mg/ml になるようそれぞれ入れた。菌の数が減っている培地にサンプルを 0.7 mg/ml 入ると (Control 1) 生育は数時間抑えられた後通常に上がってきた。一方サンプルを 1.5 mg/ml まで入れたら (Control 11) 数の増えた菌も 168 時間以上で生育が抑制された。その Control 11 試験管とサンプルを最初から 1.0 mg/ml 加えた試験管を培養時間 168 時間で無菌的に開け、培地を遠心分離して菌細胞を取り出し、無菌水で 2 回洗ってから普通の培地に戻して培養を続けた。その結果、両方共菌が通常通り生育してきたことが見られた。結論として下記のことが挙げられる。

【0023】表 2 は本発明物質群の各細菌における生育抑制最低濃度 (MIC) を示す表である。

【表 2】

(1) 本発明の物質群の最適な使用量は菌の数に適しており、サンプルの濃度を高めれば増えた数にも対応できる。

(2) 本発明の物質群はその使用量によって菌の発育を長時間抑制できる。

(3) 本発明の物質群の効果は可逆的で、菌を元の培地に戻すと通常に生育する。

【0026】図 8 は *Micrococcus luteus* (細菌の一種) の生育に及ぼすサンプルの影響を示す顕微鏡撮影写真である。

(a) の写真は *Micrococcus luteus*

(b) の写真は *Micrococcus luteus*

(c) の写真は *Micrococcus luteus*

菌を通常の培地で12時間培養後に撮ったものである。菌は通常通り生育し、細胞分裂も通常に起こっていることがわかる。

(b)の写真は培地にサンプルが2.5mg/ml入っていて同じく12時間培養後に撮ったものである。菌の細胞が膨張している上、分裂も完全に止らず二つの細胞がくっついていることが分かる。

【0027】図9(a)の写真は*Escherichia coli* (大腸菌)、(b)の写真は*Salmonella enteritidis* (サルモネラ腸炎菌)それぞれの生育に及ぼすサンプルの影響を示す電子顕微鏡写真である。両方共サンプルを2.5mg/ml入れた培地に菌を12時間培養後に撮った写真でどちらも菌の細胞壁が膨張し一部が突き出ていることが分かる。

【0028】応用の具体性を下記に記す。食品分野では① 畜産、水産物への「抗菌剤」使用は、O-157菌、サルモネラ菌の食中毒害菌化を促す要因となるが「発明物質」を餌に加えることで、「害菌繁殖を防止し、害菌の繁殖」が防げる。農薬使用の軽減可能。

② 現在約130種類の食品添加剤が認可され食品分野に用いられるが、その主体である「抗菌性」が「発明剤」の使用で安全にできる。

③ 第1次産品の食材の保存で、主体となる「細菌繁殖防止剤」を用いるが「発明剤」で安全な蒸気防止が可能となる。化粧品分野では

④ トイレタリー分野の「殺菌剤」は必ずしも人体にとって無害でないものが含まれるが、安全で肌に相応しいpHの殺菌効果の「洗浄剤」ができる。

⑤ 肌に付着させる様々な化粧品の品質保持成分も、必ずしも安全で刺激性が無いと言えない。「発明剤」の添加でこの問題が解決できる。医薬品分野では、

⑥ AからWまでに既に見、発明された物質は全てカビ菌からつくもので、非常に高価なもの。酵母からつくことで安全で安価な新しい「抗生物質」の生産ができる。

⑦ 細胞の分裂(増殖)を抑止する機能は、ガン細胞、エイズウイルス、脳細胞などの分裂、増殖を抑止する可能性を持つ分野。

⑧ 本発明が害菌の繁殖を抑止することはゼータや写真にあるように明らかであり、更に「自己免疫機能」による自然治療効果が期待される分野。

【0029】サイトカラニン緑物質群(全く同じ菌が長く似た性状の新物質群が定かでない)は全てカビ類から抽出していた。医療分野でも既にこれまで様々な可能性を持っている。しかし、本発明は「酵母起源」で初めての物質として抗菌性、細胞分裂抑制機能とその可逆性を立証して、広い範囲の「食品」に先ず応用できることが特徴であり、化粧品、医薬品へと付加価値の高い分野へ利用できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】*Bacillus toyoi* (バチルス、桿菌の一種)に対しての抗菌性を示す図である。

【図2】*Escherichia coli* (大腸菌)に対しての抗菌性を示す図である。

【図3】*Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌)に対しての抗菌性を示す図である。

【図4】(a)、(b)は*Salmonella enteritidis* (食中毒を起すサルモネラ腸炎菌)に対しての抗菌性を示す図である。

【図5】*Micrococcus luteus* (球菌の一種)に対してpH5、5での抗菌性を示す図である。

【図6】*Staphylococcus aureus* (ブドウ球菌)に対してpH5、5での抗菌性を示す図である。

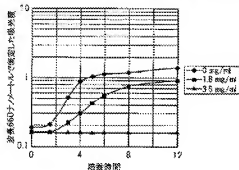
【図7】*Micrococcus luteus* (球菌の一種)におけるサンプルの抗菌性が可逆的であることを示す図である。

【図8】発明物質(酵母ジゴサッカロマイシス ロキシイよりの抽出物質)の球菌(IFO 12708 (*Micrococcus luteus*))に及びす影響を示す異相顕微鏡写真で、(a)は通常の培地で12時間培養後、(b)は発明物質2.5mg/mlの入った培地で12時間培養後に撮ったものである。

【図9】(a)は発明物質(酵母ジゴサッカロマイシス ロキシイよりの抽出物質)2.5mg/mlの入った培地で12時間培養後に撮影した大腸菌(IFO 3301 (*Escherichia coli*))の電子顕微鏡写真、(b)は発明物質(酵母ジゴサッカロマイシス ロキシイよりの抽出物質)2.5mg/mlの入った培地で12時間培養後に撮影したサルモネラ腸炎菌(IFO 3313 (*Salmonella enteritidis*))の電子顕微鏡写真である。

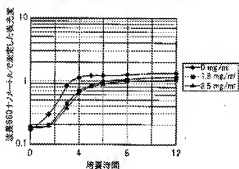
【図 1】

(a)
pH5.5における発酵物質(酵母ジブツカロマイシス ロキシイよりの抽出物質)の濃度別のバチルス(桿菌の一種 *Bacillus toyoi*)の生育曲線



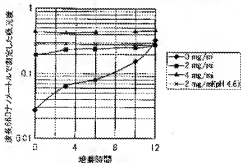
(b)

pH6.0における発酵物質(酵母ジブツカロマイシス ロキシイよりの抽出物質)の濃度別のバチルス(桿菌の一種 *Bacillus toyoi*)の生育曲線



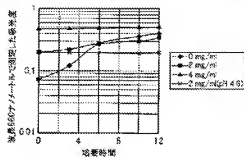
【図 3】

pH5.5における発酵物質(酵母ジブツカロマイシス ロキシイよりの抽出物質)の濃度別の緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)の生育曲線



【図 2】

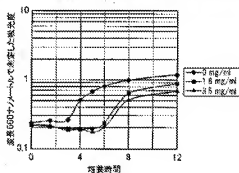
pH5.5における発酵物質(酵母ジブツカロマイシス ロキシイよりの抽出物質)の濃度別の大腸菌(*E. coli* *Escherichia coli*)の生育曲線



【図 4】

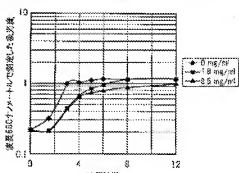
(a)

pH5.5における発酵物質(酵母ジブツカロマイシス ロキシイよりの抽出物質)の濃度別のサルモネラ腸炎菌(*S. enteritidis* *Salmonella enteritidis*)の生育曲線



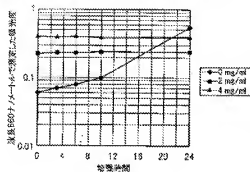
(b)

pH6.0における発酵物質(酵母ジブツカロマイシス ロキシイよりの抽出物質)の濃度別のサルモネラ腸炎菌(*S. enteritidis* *Salmonella enteritidis*)の生育曲線



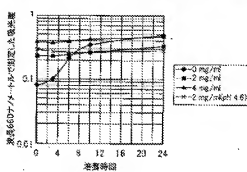
【図5】

pH5.5における発酵物質(酵母ジブツガロマイシス ロキシイよりの抽出物質)の濃度別の培養(FD 12708-Micrococcus luteus)の生育曲線



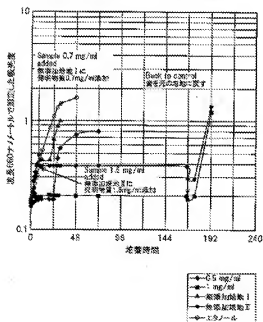
【図6】

pH5.5における発酵物質(酵母ジブツガロマイシス ロキシイよりの抽出物質)の濃度別の培養(FD 14462-Staphylococcus aureus)の生育曲線



【図7】

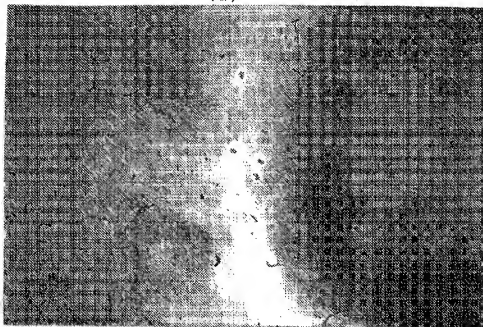
発酵物質(酵母ジブツガロマイシス ロキシイよりの抽出物質)の可溶性を示す種々の培養での培養(FD 12708-Micrococcus luteus)の生育曲線



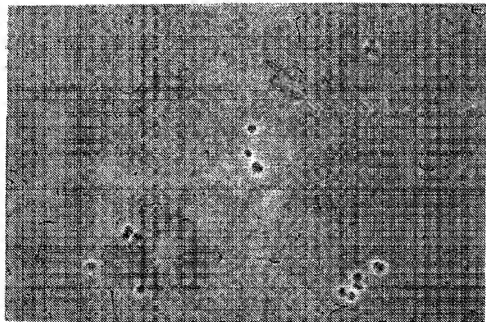
【图8】

（剖面代用写真）

（a）



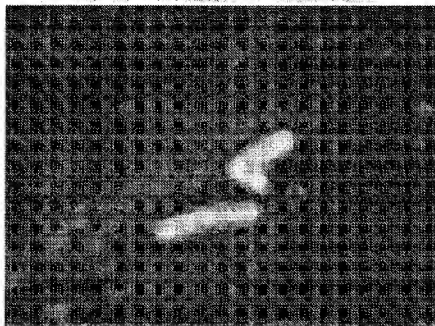
（b）



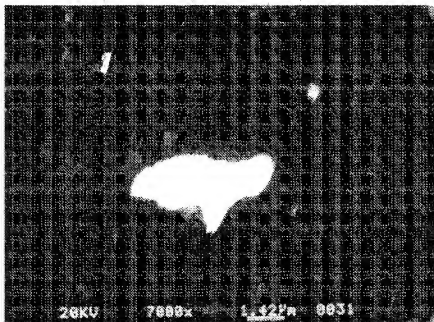
【圖9】

國産代用写真

(a)



(b)



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	ラポート (参考)
A 6 1 P 31/04		A 6 1 P 31/04	
(C 1 2 P 17/18		(C 1 2 P 17/18	C
C 1 2 R 1:645)		C 1 2 R 1:645)	
(C 1 2 N 1/16		(C 1 2 N 1/16	A
C 1 2 R 1:645)		C 1 2 R 1:645)	

Fターム (参考) 4B021 MC01 MK27 MP01 MR02
 4B064 AE48 BE97 BE14 CA06 CE08
 DA91 DA10 DA11
 4B065 AA72X AC07 AC14 AC15
 BA22 BD16 CA18 CA41 CA44
 CA50
 4C083 AA03J BB48 CC01 CC23
 EE01 FF01
 4C087 AA02 AA04 AA05 BC12 CA11
 NA14 ZB07 ZB21 ZB26 ZB33
 ZB35